

**PSORALEA CORYLIFOLIA L. O'SIMLIGIDAN AJRATILGAN
PSORALENING SITOTOKSIK FAOLLIGI.**

Erkinova K.S

Toshkent farmatsevtika instituti "Farmatsevtik biotexnologiya" mutaxassisligi 4-bosqich talabasi.

Murodova S.Z.

Toshkent farmatsevtika instituti "Farmatsevtik biotexnologiya" mutaxassisligi 4-bosqich talabasi

Abidova A.D

PhD, Toshkent Farmatsevtika instituti Farmatsevtik biotexnologiya ixtisosligi katta o'qituvchisi

Tseomashko N.E

DSc, O'zbekiston Respublikasi ixtisoslashtirilgan ruhiy salomatlik ilmiy-amaliy tibbiyot markazi, Tibbiy-biologik muammolar bo'limi mudiri,

Annotatsiya: 21-asr texnologiyasi bo'lgan PDTning salohiyati tugamaydi. O'simliklardan olingan fotosensibilizatorlarning sitotoksik ta'sirining mexanizmlari asosan o'rganilmagan. Furanokumarinlarning fotodinamik xususiyatlari ultrabinafsha nurlanishni yutish orqali ularning molekulalari qo'zg'aluvchan holatga o'tishi va bu holatda qo'sh aloqalarni o'z ichiga olgan biologik muhim hujayra komponentlari bilan reaksiyaga kirishishi bilan izohlanadi. DNK tuzilishi va funksiyasining buzilishi sitotoksiklik uchun juda muhimdir.

Kalit so'zlar: hujayra biologiyasi usullari, sitotoksiklikni baholash usullari, fotodinamik terapiya.

**CYTOTOXIC ACTIVITY OF PSORALEN ISOLATED FROM THE PLANT
PSORALEA CORYLIFOLIA L.**

Erkinova K.S

*fourth-year student at the Tashkent Pharmaceutical Institute, majoring in
Pharmaceutical Biotechnology*

Murodova S.Z

*fourth-year student at the Tashkent Pharmaceutical Institute, majoring in
Pharmaceutical Biotechnology*

Abidova A.D

*PhD, senior lecturer at the Tashkent Pharmaceutical Institute, majoring in
Pharmaceutical Biotechnology*

Tseomashko N.E

*DSc, Head of the Department of Medical and Biological Problems, Republican
Specialized Scientific and Practical Medical Center for Mental Health, Uzbekistan*

Abstract: *The potential of PDT, a 21st-century technology, is far from exhausted. The mechanisms of cytotoxic action of plant-derived photosensitizers remain largely unexplored. The photodynamic properties of furanocoumarins are explained by the fact that by absorbing ultraviolet radiation, their molecules enter an excited state and, in this state, are capable of reacting with biologically important cellular components containing double bonds. Disruption of DNA structure and function is crucial for cytotoxicity.*

Key words: *cell biology methods, cytotoxicity assessment methods, photodynamic therapy.*

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПСОРАЛЕНА ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ РАСТЕНИЯ PSORALEA CORYLIFOLIA L.

Эркинова К.С

*студентка 4-курса Ташкентского Фармацевтического института, направление
Фармацевтическая биотехнология*

Муродова С.З

*студентка 4-курса Ташкентского Фармацевтического института, направление
Фармацевтическая биотехнология*

Абидова А.Д

*PhD, старший преподаватель Ташкентского Фармацевтического института,
направление Фармацевтическая биотехнология*

Цеомашко Н.Е

*DSc, Зав.отд.медико-биологических проблем Республиканского
Специализированного научно-практического медицинского центра психического
здоровья, Узбекистан*

Ключевые слова: *методы клеточной биологии, методы оценки
цитотоксичности фотодинамическая терапия.*

Аннотация: *Потенциальные возможности ФДТ, являющейся технологией XXI столетия, далеко еще не исчерпаны. Практически не изучены механизмы цитотоксического действия фотосенсибилизаторов растительного происхождения. Фотодинамические свойства фуранокумаринов объясняются тем, что поглощая кванты ультрафиолетового излучения, их молекулы переходят в возбужденное состояние и в таком виде способны реагировать с биологически важными клеточными компонентами, содержащими двойную связь. При этом решающее значение для цитотоксичности имеет нарушение структуры и функции ДНК.*

В традиционной китайской медицине широко используется лекарственное растение *Psoralea corylifolia* L., также, как и среднеазиатский инжир, богатый фуранокумаринами, в частности псораленом. Установлено, что экстракты данного растения, используемого в китайской медицине издревле, действительно эффективно в терапии ряда патологий, за счёт своих антиоксидантных, антибактериальных,

цитотоксических, противовирусных и других свойств обусловленных в первую очередь наличием фурукумаринов [2]. Псорален, являясь основным активным компонентом *Psoralea corylifolia* L., защищает хрящевые и костные ткани, в частности стимулирует пролиферативную активность и дифференциацию хондроцитов и остеобластов [10; 12], обладает цитотоксическим и противоопухолевым действием [3; 5; 7; 8], иммуномодулирующей активностью [6], эффективен в терапии витилиго [1], обладает противовоспалительной активностью [2; 11]. Псорален предлагают использовать в профилактике и терапии остеопороза [13] и др. Изучены цитотоксичность, фармакотоксичность, антиоксидантный статус и воздействия на кальций зависимые каналы мембран митохондрий в норме и при ФДТ индивидуальных соединений псоралена (95 % чистоты), англецина (изопсорален) и препарата псоберана - смесь двух фурукумаринов (псоралена и бергаптена), выделенных в ИХРВ АН РУз из листьев *Ficus carica* L. семейства Могасеае, а также метиленовый синий и индигокармин, в качестве сравнения. Спектр использования культур клеток в научных и медицинских целях очень велик, при этом основное преимущество использования в научных исследованиях культур клеток заключается в возможности прижизненного наблюдения за ними с помощью микроскопа. Другим преимуществом клеток является то, что ощутимые результаты можно получить при использовании ограниченного числа клеток. На культурах клеток удобно проводить различного рода биохимических, генетических, цитотоксических исследований.

Зная концентрацию исследуемых соединений и время экспозиции на клетках можно получить реальные значения скорости включения или метаболизма соединений, определить механизм действия. В этой связи на культурах клеток проводят скрининг химических соединений, косметических средств, лекарственных препаратов и их составляющих, пестицидов на цитотоксическую, антиоксидантную, пролиферативную, метаболическую и другие активности [14]. Выявленная взаимосвязь между чувствительностью к лекарству культур опухолевых клеток человека в системе *in vitro* и соответствующих опухолей в системе *in vivo* подтолкнуло к использованию данных культур для скрининга лекарственных средств [17]. О высокой положительной корреляции тестов *in vitro* и *in vivo* утверждается во многих научных работах, что позволяет в настоящее время говорить о высокой эффективности скрининга на цитотоксичность химических соединений методами *in vitro* [16; 15]. Ультрафиолетовое излучение в диапазоне УФ-А с длиной волны 320–400 нм, а для некоторых соединений и в видимой области спектра с большей вероятностью вызывает реакции фотосенсибилизации, чем УФ-В (290–320 нм). Действие ФС на клетки чаще всего связывают с деструкцией наружных или внутренних клеточных мембран в результате фотоинактивации. Оказались эффективными катионные ФС или специальные средства для увеличения проницаемости в клетку [9].

Кроме того по противоопухолевой активности данные противоречивые – ряд авторов публикуют данные о цитотоксичности псоралена по отношению к культурам злокачественно-трансформированных клеток [3; 5; 8], но есть и данные о возможности

вызывать злокачественные перерождения клеток кожи при длительном использовании фототерапии [4; 10].

2. Изучение цитотоксической активности.

Изучена цитотоксическая активность препаратов псоралена и псоберана на культурах нормальных и патологически трансформированных клеток (клетки рака гортани Нер-2, рака шейки матки HeLa, нормальных клеток печени- гепатоцитов и клеток соединительной ткани - фибробластов). Исследования на культурах перевиваемых линий злокачественно трансформированных клеток проведены в лаборатории молекулярной генетики ИХРВ АН РУз к.б.н. Терентьевой Е.О. под руководством профессора Азимовой Ш.С.

2.1. Получение культур мононуклеарных клеток крови.

Кровь берут у здоровых доноров в возрасте от 20 до 40 лет, не болевших вирусными заболеваниями за последние полгода, в пробирку, обработанную раствором гепарина (38,5 мг/мл гепарина). Цельную кровь смешивают с равным объемом среды ДМЕМ или RPMI-1640 (без L-глутамин) и осторожно наслаивают на градиентную смесь фикола Ficoll-Paque PLUS или фикола-урографина (или аналогичную) плотностью 1,077 и центрифугируют при 4500 об/мин в течение 40 мин (рис. 1). Образующееся на разделе фаз «кольцо» из мононуклеаров аккуратно отбирают пипеткой и дважды отмывают средой ДМЕМ или RPMI-1640, центрифугируя при 4500 об/мин в течение 10 мин. После второй отмывки осадок разводят в 1 мл. среды ДМЕМ или RPMI-1640, содержащих 10% FBS, 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина. В полученной клеточной суспензии подсчитывают число ядродержащих клеток в 1 мл и определяют их жизнеспособность. После переносят в 96 луночные планшеты и 24 луночные планшеты из расчёта 5 тысяч клеток и 20 тысяч клеток на лунку, соответственно [18]. Оценку количества живых и погибших клеток проводили на автоматическом счётчике клеток (Cauntress Automatic Cell Counter, Invitrogen, Германия) с использованием слайсов для подсчёта клеток на основе трипанового синего (Invitrogen, Германия).

2.2. Получение культур клеток фибробластов.

Экспланты дермы размером 1-5 мм² помещают в раствор 1*PBS и антибиотика канамицина (12,5 мкг/мл) на 15 минут. После чего экспланты дважды отмывают от антибиотика раствором 1*PBS и помещают в культуральные флаконы, дермой вниз. После закрепления эксплантов добавляют в каждый культуральный флакон ростовую среду DMEM/F-12, содержащую 10% фетальной сыворотки теленка - FBS и 1 % раствора антибиотика-антимикотика (10000 ед/мл пенициллина, 10000 мкг/мл стрептомицина и 25 мкг/мл амфотерицина В), чтобы среда покрывала экспланты не больше, чем на 1 мм. Культуральные флаконы с эксплантами помещают в CO₂-инкубатор и инкубируют при +37°C, 5% CO₂ в течение ночи со слегка отвинченными крышками. На следующий день культуральные флаконы плотно закручивают, а еще через день среду заменяют на новую по 4 мл в каждый культуральный флакон. После образования монослоя клетки диссоциируют механически, используя одноразовые скрабы. Культуры клеток фибробластов можно культивировать до 10-14 пассажей, т.е.

переводить из первичной культуры во вторичную. Для проведения исследований по цитотоксичности лучше всего использовать культуры клеток на 4-5 пассажах.

Для тестирования клетки после диссоциации с культуральных флаконов переносят в 96 луночные планшеты и 24 луночные планшеты из расчёта 5 тысяч клеток и 20 тысяч клеток на лунку соответственно [18].

2.3. Получение культур клеток гепатоцитов.

Для получения первичной культуры гепатоцитов, печень млекопитающего извлекают в стерильных условиях, гомогенизируют. Затем добавляют стерильный физ. раствор для отмывки клеток гепатоцитов от клеток крови и центрифугируют в течение 10 минут при 900 об/мин. Осадок клеток ресуспензируют в ростовой среде ДМЕМ, содержащей 10% FBS, 1 % раствора антибиотика-антимикотика и 2% супернатанта снятого с монослоя фибробластов, содержащего ростовые факторы и белки экстрацеллюлярного матрикса. В полученной клеточной суспензии подсчитывают число клеток в 1 мл и переносят в 96 луночные планшеты из расчёта 2 тысячи клеток на лунку. Культивируют клетки в 96 луночных планшетах в CO₂-инкубаторе при +37°C, 5% CO₂ [18].

2.4. Тест с нейтрально красным.

Для анализа клетки высевают в 96-луночные планшеты. По истечении 24 ч питательную среду заменяют средой, содержащей определенное количество тестируемых образцов и контролей, и инкубируют в CO₂-инкубаторе 72 часа. Далее планшеты отмывают дважды 1*PBS и инкубируют в свежеприготовленном растворе нейтрального-красного в среде ДМЕМ (3,3 мкг/мл) в CO₂-инкубаторе в течение 3 ч. После удаления супернатанта и тщательного промывания лунок раствором 1xPBS, в лунки вносят органический растворитель - кислый этанол по 100 мкл/лунку, встряхивая в течение 45 мин. Поглощение определяют при длине волны 540 нм. Контролем служат интактные клетки, оптическая плотность (ОП) которых принимается за 100%-ную выживаемость клеток. Жизнеспособность клеток определяют, как отношение (в процентах) абсорбции интактных клеток от неинтактных. Все эксперименты выполняют трижды для каждого вещества и концентрации, анализируют, статистически обрабатывают, и при необходимости повторяют.

Концентрация исследуемого соединения, которая вызывает 50%-ную гибель клеток (IC₅₀) может быть рассчитана графически по дозозависимой кривой [18].

2.5. МТТ-тест.

После инкубации клеток с образцами лунки отмывают от образцов и контролей стерильным раствором 1*PBS. В каждую лунку вносят по 80 мкл неполной среды ДМЕМ/F12 или RPMI-1640 (без FBS и антибиотика-антимикотика) и по 20 мкл раствора МТТ в 1xPBS 5 мг/мл. Защищают планшеты от света и ставят в инкубатор на 37°C на 4 часа. По истечении срока инкубации, лунки опустошают и вносят в каждую лунку по 100 мкл. органического растворителя диметилсульфоксида - DMSO. Через 10 минут снимают показания на спектрофотометре для микропланшет при длине волны 596 нм.

Выживаемость клеток в присутствии исследуемого соединения рассчитывают по формуле (СОП опытных лунок – СОП среды / СОП контрол. лунок – СОП среды) x

100%, где СОП – усредненный показатель оптической плотности

Концентрация исследуемого соединения, которая вызывает 50%-ную гибель клеток (IC₅₀) может быть рассчитана графически по дозо-зависимой кривой [18].

3. Основные полученные результаты.

Для изучения фотосенсибилизирующей активности новых соединений, изучения механизмов их действия на микро- и макро-уровне нами был определён алгоритм действий, подобраны методики. Были взяты препараты природного, растительного происхождения: индивидуальное соединение псорален (95 % чистоты), препарат псоберан - смесь двух фурукумаринов (псоралена и бергаптена), выделенные из листьев *Ficus carica* L. семейства Moraceae, а также фуранокумарин – англецин (изопсорален), выделенный из листьев *Psoralea drupacea* Bunge в институте химии растительных веществ (ИХРВ АН РУз) под руководством к.х.н. Шамьянова Э.Д.

Препараты псоберан, англецин и псорален представляют собой белые кристаллические порошки со специфическим ароматным запахом, часть предоставленных фракций, данных фуранокумаринов не растворимые в воде, но растворимые в этаноле, метаноле, ацетоне и в жирных маслах, часть фракций псоралена и англецина – растворимы в воде.

3.1. Результаты изучения цитотоксической активности фотосенсибилизаторов.

Проведён скрининг фурукумаринов – псоралена и псоберана на перевиваемых линиях двух типах злокачественно-трансформированных клеток человека – культуре клеток карциномы гортани (HEp-2) и культуре клеток рака шейки матки (HeLa). Культуры клеток для исследований были предоставлены д.б.н. проф. Азимовой Ш.С. Цитотоксичность и пролиферативную активность на клетках проводили с использованием нейтрально-красного метода. В качестве положительного контроля на цитотоксичность использовали высокотоксичный препарат Cisplatin (Индия). В качестве отрицательного контроля служили клетки, в которые вносили только среду культивирования (табл. 1, 2).

Таблица 1. Воздействие веществ на HEp-2 (M ± m, n = 3)

Процент подавления роста клеток фибробластов, %									
Вещество мкг/мл.	0	1,	3,	6,	1	2	5	1	2
	,7	5	0	0	2,5	5,0	0,0	00,0	00,0
Псоберан	0	0	0	0	2,0±0,02	9,5±0,6	14,02±0,1	24,4±0,4	68,1±0,5
Псорален	0	0	0	4,1±0,05	1,5±0,05	2,1,2±0,1	32,7±0,3	42,5±0,5	82,3±0,5
Cisplatin	0	9,5±0,01	19,9±0,05	40,0±0,15	55,0±0,2	69,5±0,4	72,4±0,6	90,8±0,9	96,4±0,9

Примечание: достоверное отличие от контроля P<0,05; контролем служили интактные клетки

Как видно из таблицы 1., исследуемые фурукумарины ингибируют рост клеток НЕР-2 начиная с концентрации 50 мкг/мл и выше, и менее токсичны для данного типа клеток по сравнению с препаратом Cisplatin, при этом псорален проявил большую ингибирующую активность по сравнению с псобераном. IC₅₀ псоралена для клеток НЕР-2 находится в пределах 100,0 мкг/мл. IC₅₀ псоберана для клеток НЕР-2 находится в пределах 150,0- 170,0 мкг/мл.

Таблица 2. Воздействие веществ на HeLa (M ± m, n = 3)

Процент подавления роста клеток гепатоцитов, %									
Вещество мкг/мл.	0,7	1,5	3,0	6,0	12,5	25,0	50,0	100,0	200,0
Псоберан		0	0	0,6±0,01	3,5±0,01	12,0±0,2	27,6±0,5	38,4±0,5	65,5±0,6
Псорален		0	0,9±0,01	2,8±0,01	5,5±0,01	9,5±0,2	40,5±0,5	52,5±0,5	94,7±0,8
Cisplatin		8,8±0,02	23,5±0,1	51,0±0,2	59,0±0,1	70,9±0,2	80,5±0,5	100,0±0,5	100,0±0,5

Примечание: достоверное отличие от контроля P<0,05; контролем служили интактные клетки

Как видно из таблицы 2., исследуемые фурукумарины ингибируют рост клеток HeLa начиная с концентрации 25 мкг/мл и выше, и менее токсичны для данного типа клеток по сравнению с препаратом Cisplatin, при этом псорален проявил большую ингибирующую активность по сравнению с псобераном. IC₅₀ псоралена для клеток HeLa равна 100,0 мкг/мл. IC₅₀ псоберана для клеток HeLa находится в пределах 125,0 – 150,0 мкг/мл.

Кроме скрининг фуранокумаринов проведен на двух типах первичных культур нормальных клеток млекопитающих – культуре клеток фибробластов (ККФ) и первичной культуре клеток гепатоцитов (ПКГ). Первичные культуры клеток ККФ и ПКГ были получены д.б.н. Цеомашко Н.Е. Оценку лизосомальной активности проводили нейтрально-красным методом, митохондриальной активности – методом МТТ на культурах клеток фибробластов (табл. 3, 4) и культурах клеток – гепатоцитов (табл. 5, 6.). Кроме того, на культурах мононуклеарных клеток и клеток фибробластов проведена оценка цитотоксичности путём окраски авитальным красителем – трипановосиним и подсчётом на автоматическом счётчике клеток (табл. 7).

Таблица 3. Воздействие веществ на ККФ, МТТ-тест (M ± m, n = 3)

Процент подавления роста клеток фибробластов, %									
Вещество мкг/мл.	0,7	1,5	3,0	6,0	12,5	25,0	50,0	75,0	100,0
Псоберан		0	0	0,6±0,01	3,5±0,01	12,0±0,2	27,6±0,5	38,4±0,5	65,5±0,6
Псорален		0	0,9±0,01	2,8±0,01	5,5±0,01	9,5±0,2	40,5±0,5	52,5±0,5	94,7±0,8
Cisplatin		8,8±0,02	23,5±0,1	51,0±0,2	59,0±0,1	70,9±0,2	80,5±0,5	100,0±0,5	100,0±0,5

							3				
Анг лецин		5,5± 0,19	9,9± 0,15	2,0± 0,24	8,0± 0,5	1,9± 0,5	0 0± ,1	8,0±0 ,42	00,0 ±0,1	00,0± 0,1	00,0± 0,1
Ин дигокар мин						3,9± 0,1	4,9± 0,1	3,7±0 ,32	2,5± 0,3	0,9±0 ,5	2,0±0 ,4

Примечание: достоверное отличие от контроля $P < 0,05$; контролем служили интактные клетки

Как видно из таблицы 4., лизосомальная активность фибробластов угнетается во всех исследуемых концентрациях (0,7-175 мкг/мл) всеми фракциями псоралена и псобераном, в то время как под действием англецина угнетение функций лизосом фиксировались колориметрическим методом с концентрации 1,5 мкг/мл и выше, а индигокармина – с 25,0 мкг/мл и выше, в дозозависимой манере. Стоит отметить, что лизосомальная активность клеток более чувствительна, чем митохондриальная в наших исследованиях.

Таблица 5. Воздействие веществ на ПКГ, нейтрально красный-тест
($M \pm m, n = 3$)

Процент подавления роста клеток фибробластов, %											
Ве щ-ва мкг/мл.	,7	,5	,0	,0	2,5	5,0	0,0	5,0	00	50	75
Псо рален	1,0± 0,2	1,6± 0,3	6,4± 0,3	1,7± 0,2	3,9± 0,3	0,1± 0,4	0,3± 0,1	9,0±0 ,5	4,8± 0,2	7,0±0 ,5	9,0±0 ,5
Псо рален вод орост	0,5± 0,1	8,0± 0,1	9,0± 0,2	0,9± 0,2	8,0± 0,2	2,5± 0,3	2,2± 0,4	0,0±0 ,4	9,5± 0,5	5,0±0 ,5	00,0± 0,3
Псо беран	6,4± 0,0	8,2± 0,2	8,3± 0,1	5,1± 0,2	9,9± 0,2	0,8± 0,2	6,4± 0,1	9,7±0 ,5	8,0± 0,6	00,0± 0,4	00,0± 0,4
Анг лецин	,0±0 ,01	,8±0 ,01	5,0± 0,2	5,5± 0,1	0,0± 0,2	8,7± 0,2	5,0± 0,1	5,8±0 ,15	3,3± 0,3	8,2±0 ,7	00,0± 0,6
Ин дигокар мин							0,2± 0,1	3,5±0 ,1	3,5± 0,1	6,8±0 ,2	2,0±0 ,6

Примечание: достоверное отличие от контроля $P < 0,05$; контролем служили интактные клетки

Как видно из таблицы 5., лизосомальная активность гепатоцитов угнетается во всех исследуемых концентрациях (0,7-175 мкг/мл) всеми фракциями псоралена и псобераном, но отличием от фибробластов можно отметить отсутствия явного доз зависимого эффекта и высоким порогом, что обусловлено возможно трансформирующей способностью ферментов гепатоцеллюлярной системы. Англицин статистически значимое угнетение лизосомальной активности гепатоцитов проявляет в концентрациях выше 12,5 мкг/мл, а индигокармин - 50,0 мкг/мл.

Таблица 6. Воздействие веществ на ПКГ, МТТ-тест ($M \pm m, n = 3$)

Процент подавления роста клеток фибробластов, %											
Вещ-ва мкг/мл.	0,7	1,5	3,0	6,0	12,5	25,0	50,0	75,0	150,0	300,0	750,0
Псорален	2,0± 0,1	8,6± 0,2	2,6± 0,2	5,5± 0,2	8,9± 0,3	0,2± 0,3	1,4± 0,3	9,8± 0,4	4,5± 0,4	00,0± 0,6	00,0± 0,7
Псорален водорост	8,5± 0,1	8,0± 0,1	4,0± 0,1	6,9± 0,1	1,0± 0,3	5,5± 0,3	6,2± 0,3	5,0± 0,3	9,3± 0,3	1,7± 0,4	00,0± 0,9
Псоберан	6,4± 0,1	8,2± 0,2	8,3± 0,2	5,9± 0,2	9,9± 0,3	0,8± 0,3	6,4± 0,3	0,7± 0,4	8,9± 0,6	00,0± 0,6	00,0± 0,6
Англицин				5,5± 0,1	4,0± 0,1	3,7± 0,1	8,7± 0,1	1,8± 0,1	0,3± 0,2	6,2± 0,3	3,4± 0,7
Индигокармин						2,2± 0,01	0,8± 0,01	8,3± 0,01	1,6± 0,1	1,1± 0,1	2,0± 0,2

Примечание: достоверное отличие от контроля $P < 0,05$; контролем служили интактные клетки

Как видно из таблицы 6., митохондриальная активность гепатоцитов угнетается во всех исследуемых концентрациях (0,7-175 мкг/мл) всеми фракциями псоралена и псобераном, но отличием от фибробластов можно отметить также отсутствия явного доз зависимого эффекта и присутствие высокого порога. Англицин статистически значимое угнетение активности митохондрий гепатоцитов проявляет в концентрациях выше 25,0 мкг/мл, а индигокармин - 100,0 мкг/мл.

В связи с разнящимися результатами, полученными разными колориметрическими методами на разных культурах клеток, для более точного определения показателей IC_{50} были проведены скрининги всех веществ в высоких дозах с использованием авитального красителя и автоматического счётчика клеток (табл. 7).

Таблица 7. Воздействие веществ на ККФ и мононуклеарные клетки крови, тест трипаново-синий и подсчёт на автосчётчике клеток ($M \pm m$, $n = 3$)

Процент подавления роста клеток фибробластов, %										
Клетки	ККФ					Мононуклеарные клетки крови				
Вещ-ва МКГ/мл.	0,0	5,0	00	50	75	0,0	5,0	00	50	75
Псорален	0,0±0,3	5,0±0,4	2,6±0,4	00±0,7	00±0,6	3,3±0,1	0,6±0,2	9,1±0,4	3,3±0,4	00,0±0,7
Псорален водорост	6,5±0,2	0,0±0,2	4,4±0,4	7,9±0,5	8,8±0,5	2,6±0,1	1,2±0,1	2,0±0,1	9,0±0,4	00±0,6
Псоберан	6,4±0,2	8,2±0,5	00±0,5	00±0,5	00±0,3	0,8±0,3	6,4±0,3	5,3±0,3	00±0,6	00,0±0,6
Англицин	9,5±0,2	9,1±0,4	7,5±0,5	0,0±0,6	00±0,6	8,7±0,1	8,7±0,2	1,8±0,5	0,9±0,6	00±0,6
Индигокармин	1,1±0,01	9,7±0,1	0,1±0,2	9,0±0,4	7,8±0,4	9,2±0,04	1,8±0,1	8,3±0,1	1,6±0,3	6,4±0,5

Примечание: достоверное отличие от контроля $P < 0,05$; контролем служили интактные клетки

Как видно из таблицы 7, IC_{50} для спирторастворимого псоралена будет находиться в пределах 75,0 мкг/мл, IC_{50} для водорастворимого псоралена будет находиться в пределах 100,0 мкг/мл, для псоберана – 50,0 мкг/мл, для англицина - 100,0 мкг/мл, для индигокармина - 150,0 мкг/мл.

Таким образом, установлено, что апоптоз клеток данные соединения запускают в концентрации начиная от 50 мкг/мл и дозозависимо. В результате IC_{100} для водорастворимого псоралена наблюдалось при 175 мкг/мл, для спирторастворимого псоралена - при 150 мкг/мл, для спирторастворимого псоберана – при 75 мкг/мл, для англицина – при 150 мкг/мл и индигокармина – при 200 мкг/мл. Повышение концентрации фотосенсибилизаторов в культуральной среде приводит в первую очередь к подавлению лизосомальной активности, затем угнетается функция митохондрий.

Кроме того, на культурах клеток фибробластов, как самых распространённых клеток организма, проведены исследования протективных и цитотоксических свойств ФС под действием ФДТ на клетки, в данном случае с фуранокумаринами в качестве ФТД использованы УФ-лучи с длиной волны 340 нм. Для этих исследований

фибробласты в количестве 5 тыс на лунку пересевали в 96 луночные планшеты. Через сутки наносили разные концентрации веществ триплетами в лунки. Исследованы 3 вещества псорален, псоберан и англицин в концентрациях 200 мкг/мл, 100 мкг/мл, 50 мкг/мл, 25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 6,22 мкг/мл, 3,12 мкг/мл, 1,56 мкг/мл, 0,78 мкг/мл. В качестве контроля были взяты интактные клетки, без внесения химических веществ. После внесения исследуемых веществ в лунки с клетками в условиях ламинарного бокса включали УФ на высоте 30 см над 96 луночным планшетом с клетками на 10 минут. После экспозиции клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение суток, а затем исследовали с использованием теста с нейтрально красным. Определение соотношения между живыми и мертвыми клетками проводят с помощью спектрофотометра.

Таблица 8. Процент живых клеток фибробластов, после УФ облучения

Вещество	Концентрация, мкг/мл								
	200	100	50	25	12,5	6,22	3,12	1,56	0,78
Пс (водор)	5	9	1	1	1	1	1	1	11
	%	9%	00%	09%	12%	07%	10%	10%	4%
Пс	0	9	9	1	1	9	9	1	10
	%	8%	9%	00%	03%	0%	9%	00%	0%
Псоб	2	8	9	1	1	1	1	1	10
	9%	8%	7%	10%	09%	16%	18%	00%	0%
Англ	4	1	1	1	1	1	1	1	11
	5%	00%	12%	14%	30%	25%	10%	15%	5%
Индигок	3	6	8	7	8	8	6	6	78
	%	1%	0%	8%	0%	0%	9%	0%	%

Примечание: количество интактных клеток принимаются за 100%

Из таблицы 8 видно, после воздействия на клетки УФ-облучения на фоне интактных клеток, чья пролиферативная активность снизилась ярко проявились протективные свойства ФС, т.е. клетки в лунках с ФС не подверглись отрицательному воздействию УФ лучей и продолжили рост и деление. Наиболее выраженными протективными свойствами в наших исследованиях обладают ангелицин, псоберан и водорастворимый псорален в концентрации от 50 до 0,7 мкл/мл, включительно.

Проведён скрининг различных концентраций данных соединений на различных культурах клеток, как первичных (нормальных), так и перевиваемых (злокачественно-трансформированных). Исследования на перевиваемых линиях клеток проводились в лаборатории молекулярной генетики ИХРВ АН РУз под руководством проф. Азимовой Ш.С. Установлено, что исследуемые фуранокумарины ингибируют рост клеток Нер-2 начиная с концентрации 50 мкг/мл и выше, и менее токсичны для данного типа клеток по сравнению с препаратом Cisplatin, при этом псорален проявил большую ингибирующую активность по сравнению с псобераном. IC₅₀ псоралена для клеток Нер-2 находится в пределах 100,0 мкг/мл. IC₅₀ псоберана для клеток Нер-2 находится в пределах 150,0- 170,0 мкг/мл. Исследуемые фуранокумарины ингибируют рост клеток HeLa начиная с концентрации 25 мкг/мл и выше, и менее токсичны для данного типа

клеток по сравнению с препаратом Cisplatin, при этом псорален проявил большую ингибирующую активность по сравнению с псобераном. IC_{50} псоралена для клеток HeLa равна 100,0 мкг/мл. IC_{50} псоберана для клеток HeLa находится в пределах 125,0 – 150,0 мкг/мл.

Кроме скрининг фуранокумаринов проведен на двух типах первичных культур нормальных клеток млекопитающих – культуре клеток фибробластов (ККФ) и первичной культуре клеток гепатоцитов (ПКГ). Первичные культуры клеток ККФ и ПКГ были получены д.б.н. Цеомашко Н.Е. Оценку лизосомальной активности проводили нейтрально-красным методом, митохондриальной активности – методом МТТ на культурах клеток фибробластов и культурах клеток – гепатоцитов. Кроме того, на культурах мононуклеарных клеток и клеток фибробластов проведена оценка цитотоксичности путём окраски авитальным красителем – трипаново синим и подсчётом на автоматическом счётчике клеток. Установлено, что митохондриальная активность фибробластов угнетается во всех исследуемых концентрациях (0,7-175 мкг/мл) всеми фракциями псоралена и псобераном, в то время как под действием англедицина угнетение функций митохондрий фиксировались колориметрическим методом только с концентрации 3,0 мкг/мл и выше, а индигокармина – с 50,0 мкг/мл и выше, в дозозависимой манере. Лизосомальная активность фибробластов угнетается во всех исследуемых концентрациях (0,7-175 мкг/мл) всеми фракциями псоралена и псобераном, в то время как под действием англедицина угнетение функций лизосом фиксировались колориметрическим методом с концентрации 1,5 мкг/мл и выше, а индигокармина – с 25,0 мкг/мл и выше, в дозозависимой манере. Стоит отметить, что лизосомальная активность клеток более чувствительна, чем митохондриальная в наших исследованиях. Лизосомальная активность гепатоцитов угнетается во всех исследуемых концентрациях (0,7-175 мкг/мл) всеми фракциями псоралена и псобераном, но отличием от фибробластов можно отметить отсутствия явного доз зависимого эффекта и высоким порогом, что обусловлено возможно трансформирующей способностью ферментов гепатоцеллюлярной системы. Англедицин статистически значимое угнетение лизосомальной активности гепатоцитов проявляет в концентрациях выше 12,5 мкг/мл, а индигокармин - 50,0 мкг/мл. Митохондриальная активность гепатоцитов угнетается во всех исследуемых концентрациях (0,7-175 мкг/мл) всеми фракциями псоралена и псобераном, но отличием от фибробластов можно отметить также отсутствия явного доз зависимого эффекта и присутствие высокого порога. Англедицин статистически значимое угнетение активности митохондрий гепатоцитов проявляет в концентрациях выше 25,0 мкг/мл, а индигокармин - 100,0 мкг/мл.

В связи с разняющимися результатами, полученными разными колориметрическими методами на разных культурах клеток, для более точного определения показателей IC_{50} были проведены скрининги всех веществ в высоких дозах с использованием авитального красителя и автоматического счётчика клеток. В результате установлено, что IC_{50} для спирторастворимого псоралена будет находиться в пределах 75,0 мкг/мл, IC_{50} для водорастворимого псоралена будет находиться в пределах 100,0 мкг/мл, для

псоберана – 50,0 мкг/мл, для англедицина - 100,0 мкг/мл, для индигокармина - 150,0 мкг/мл.

Таким образом, установлено, что апоптоз клеток данные соединения запускают в концентрации начиная от 50 мкг/мл и дозозависимо. В результате IC₁₀₀ для водорастворимого псоралена наблюдалось при 175 мкг/мл, для спирторастворимого псоралена - при 150 мкг/мл, для спирторастворимого псоберана – при 75 мкг/мл, для ангилицицина – при 150 мкг/мл и индигокармина – при 200 мкг/мл. Повышение концентрации фотосенсибилизаторов в культуральной среде приводит в первую очередь к подавлению лизосомальной активности, затем угнетается функция митохондрий.

Кроме того, на культурах клеток фибробластов, как самых распространённых клеток организма, проведены исследования протективных и цитотоксических свойств ФС под действием ФДТ на клетки, в данном случае с фуранокумаринами в качестве ФТД использованы УФ-лучи с длиной волны 340 нм. Для этих исследований фибробласты в количестве 5 тыс на лунку пересевали в 96 луночные планшеты. Через сутки наносили разные концентрации веществ триплетами в лунки. Исследованы 3 вещества псорален, псоберан и англедицин в концентрациях 200 - 0,78 мкг/мл. В качестве контроля были взяты интактные клетки, без внесения химических веществ. После внесения исследуемых веществ в лунки с клетками в условиях ламинарного бокса включали УФ на высоте 30 см над 96 луночным планшетом с клетками на 10 минут. После экспозиции клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение суток, а затем исследовали с использованием теста с нейтрально красным. В результате установлено, что после воздействия на клетки УФ-облучения на фоне интактных клеток, чья пролиферативная активность снизилась ярко проявились протективные свойства ФС, т.е. клетки в лунках с ФС не подверглись отрицательному воздействию УФ лучей и продолжили рост и деление. Наиболее выраженными протективными свойствами в наших исследованиях обладают англедицин, псоберан и водорастворимый псорален в концентрации от 50 до 0,7 мкл/мл, включительно.

ВЫВОДЫ

1. IC₅₀ на нормальных первичных культурах клеток для спирторастворимого псоралена составляет 75,0 мкг/мл, для водорастворимого псоралена - 100,0 мкг/мл, для псоберана – 50,0 мкг/мл, для англедицина - 100,0 мкг/мл, для индигокармина - 150,0 мкг/мл.

2. ФС проявили протективные свойства на клетках фибробластов в эксперименте с УФ-облучением культур клеток. Наиболее выраженными протективными свойствами обладали англедицин, псоберан и водорастворимый псорален в концентрация от 50 до 0,7 мкл/мл.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Bansal S., Sahoo B., Garg V. Psoralen-narrowband UVB phototherapy for the treatment of vitiligo in comparison to narrowband UVB alone // Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine. – 2013. – 29, -6. – pp. 311–317.

2. Chopra B., Dhingra A. K., Dhar K. L. *Psoralea corylifolia* L. (Buguchi)—folklore to modern evidence: review // *Fitoterapia*. – 2013. -90. – pp. 44–56.
3. Hsieh M.-J., Chen M.-K., Yu Y.-Y., Sheu G.-T., Chiou H.-L. Psoralen reverses docetaxel-induced multidrug resistance in A549/D16 human lung cancer cells lines // *Phytomedicine*. – 2014. -21, -7. – pp. 970–977.
4. Imafuku K, Hata H, Yanagi T, Kitamura S, Inamura-Takashima Y, Nishimura M, Kitamura S, Moriwaki S, Shimizu H. // *Clin Exp Dermatol*. – 2017. -42, -5. – pp. 523-526.
5. Jiang Z., Xiong J. Induction of apoptosis in human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells in vitro by psoralen from *Psoralea corylifolia* // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2014. – 70, -2. – pp. 1075–1081.
6. Jin H., Wang L., Xu C., et al. Effects of *Psoraleae fructus* and its major component psoralen on Th2 response in allergic asthma // *American Journal of Chinese Medicine*. – 2014. – 42, -3. – pp. 665–678.
7. Khafagy N. H., Salem S. A. M., Ghaly E. G. Comparative study of systemic psoralen and ultraviolet A and narrowband ultraviolet B in treatment of chronic urticaria. // *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*. -2013. -29, -1. – pp.12–17.
8. Lu H., Zhang L., Liu D., Tang P., Song F. Isolation and purification of psoralen and isopsoralen and their efficacy and safety in the treatment of osteosarcoma in nude rats. // *African Health Sciences*. – 2014. – 14, - 3. – pp. 641–647.
9. M.R. Hamblin, Y.-Y. Huang. Low-level laser therapy in the treatment of pain // *Handbook of Photomedicine / Edited by M.R. Hamblin, Y.-Y. Huang*. – Boca Raton – London – New York: CRC Press. - 2016. – P. 601.
10. Tang D.-Z., Yang F., Yang Z., et al. Psoralen stimulates osteoblast differentiation through activation of BMP signaling. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2011. – 405, - 2. - 256–261.
11. Wolf P., Nghiem D. X., Walterscheid J. P., et al. Platelet-activating factor is crucial in psoralen and ultraviolet A-induced immune suppression, inflammation, and apoptosis. // *American Journal of Pathology*. -2006. -169, -3. – pp. 795–805.
12. Yang L., Sun X., Geng X. Effects of psoralen on chondrocyte degeneration in lumbar intervertebral disc of rats. // *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. – 2015. – 28, -2. – pp. 667–670.
13. Yang Z., Huang J.-H., Liu S.-F., et al. The osteoprotective effect of psoralen in ovariectomy-induced osteoporotic rats via stimulating the osteoblastic differentiation from bone mesenchymal stem cells. // *Menopause*. – 2012. -19, -10. – pp. 1156–1164.
14. Gao SY, Gong YF, Sun QJ, Bai J, Wang L, Fan ZQ, Sun Y, Su YJ, Gang J, Ji YB. Screening Antitumor Bioactive Fraction from *Sauromatum giganteum* (Engl.) Cusimano & Hett and Sensitive Cell Lines with the Serum Pharmacology Method and Identification by UPLC-TOF-MS// *Molecules*. – 2015. – vol. 20, N3. – pp. 4290-4306
15. Knauer K., Lampert C., Gonzalez V. Comparison of in vitro and in vivo acute fish toxicity in relation to toxicant made of action// *Chemosphere*. – 2007. – vol. 68. –pp. 1435-1441

16. Marzaro G, Chilin A. QSAR and 3D-QSAR models in the field of tubulin inhibitors as anticancer agents// *Curr Top Med Chem.* – 2014. – vol. 14, N20. – pp. 2253-2262.

17. Rezacova K, Canova K, Bezrouk A, Rudolf E. Selenite induces DNA damage and specific mitochondrial degeneration in human bladder cancer cells// *Toxicol In Vitro.* – 2016. – vol. 32. – pp. 105 – 114.

18. Tseomashko N.Y. Azimova Sh.S., Urakov B.A. Evaluation of the cytotoxicity of drugs, medical devices, cosmetics, chemicals, pesticides and veterinary funds. - Guidelines of Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan, №8N-P/18. - 2016. – p. 46